SÄULENCHROMATOGRAPHIE UND ANTIGENSTRUKTUR VON ADENOVIRUS-TOXINEN

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Cong Xuan NGUYEN

Saarbrücken

1972

Aus der virologischen Abteilung
(Leiter: Professor Dr. med. R. Wigand)
des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie
(Direktor: Professor Dr.med.Dr.phil.W. Zimmermann)
der Universität des Saarlandes

Säulenchromatographie und Antigenstruktur von Adenovirus-Toxinen

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde

der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
Cong Xuan N g u y e n
aus Cocong, Süd-Vietnam
geboren am 1o. April 1932

Homburg/Saar 1972

Dekan: Prof.Dr.H. Kulenkampff

Referent: Prof. Dr. R. Wigand

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 11. 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

I. EINLEITUNG

1. Geschichtliches

Im Verlauf langjähriger ätiologischer Untersuchungen isolierten HILLEMANN und WERNER (1954) von einem Falle primär atypischer Pneumonie während des Winters 1952/53 aus Rachenspülwasser ein Agens, das auf HeLa-Zellen, einer Gewebekultur menschlicher Cervix-Tumorzellen, nach zwei Tagen zur vollständigen Zerstörung des Zellrasens führte. Komplementbindungsreaktion (KBR) und Serumneutralisation zeigten, daß es sich um einen unbekannten Erreger handelte, der sich auch bei anderen respiratorischen Infekten als recht häufige Ursache erwies. HILLEMANN und WERNER nennen ihn RI-67, da er beim 67. untersuchten Fall " respiratory illness" isoliert worden war.

Zur gleichen Zeit gelang es der Gruppe um ROWE et al. (1953) ein latentes Virus aus kindlichem Tonsillenmaterial zu isolieren, das bestimmte zellschädigende Wirkung aufwies. Es vermehrte sich auch in anderen menschlichen Geweben, wo es einen gleichartigen, charakteristischen, cytopathogenen Effekt (CPE) verursachte. Dieser CPE besteht in einer Abrundung der einzelnen Zelle. Verdeutlichung ihrer Grenzen und Klumpung, oder Retraktionen, die zu Lücken im Zellrasen führen. Feinmikroskopisch läßt sich Vergrößerung und Eosinophilie der Zellkerne mit basophilen Einschlüssen beobachten (BOYER, G.S., LEUCHTENBERGER, C. und GINSBERG, H.S. 1957).

Aus Herkunft und Verhalten ergab sich die Bezeichnung " adenoid degeneration agent", kurz AD-agent.

Für die üblichen Labortiere war es apathogen. Es war durch bakteriendichte Filter passierbar, resistent gegen Antibiotika und zeigte keine Vermehrung außerhalb der Wirtszelle. Damit erfüllte es die Kriterien, um als Virus bezeichnet zu werden. Weiterhin ließen sich gruppenspezifische komplementbindende und typenspezifische neutralisierende Antikörper beim Menschen nachweisen. Die KBR zeigt die Verwandtschaft zwischen RI-67 und den AD-agents auf (ROWE, HUEBNER,HARTLEY, WARD und PARROT 1955).

Nach ihrem Tropismus wurden die Viren der sich abzeichnenden Gruppen als " adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents" (APC) bezeichnet (HUEBNER, ROWE, WARD, PARROT und BELL 1954), bis 1955 eine Zahl interessierter Forscher den Namen Adenoviren allgemein einführte (ENDERS, BELL, DINGLE, FRANCIS, HILLEMANN, HUEBNER und PAYNE 1956).

Zur Zeit kennt man 31 vom Menschen isolierte Virustypen, welche serologisch voneinander abgegrenzt werden. Sie unterscheiden sich zum Teil beträchtlich in ihren Eigenschaften und in ihrer klinischen Bedeutung. Daneben kommen Adenoviren auch bei Affen, Rindern, Hunden, Mäusen und Vögeln vor.

Die Adenoviren gehören zur Gruppe der DNS-Viren (BARSKI 1956). Sie sind mittelgroße Viren (70 - 80 mμ) mit kubischer Symmetrie. Sie enthalten einen DNS-haltigen Innenkörper und eine aus 252 Kapsomeren aufgebaute Protein-Außenschicht. Eine umhüllende Membran fehlt. Eine 24-stündige Behandlung mit 2o %-igem Äther bei 2 ^{o} C überstehen die Viren, ohne an Infektiosität zu verlieren (ROWE et al 1955). Adenoviren vermehren sich gut in Gewebekulturen der homologen Species. Die Vermehrung läuft überwiegend im Zellkern ab unter Ausbil-

dung intranuklearer Einschlußkörper und eines typischen cytopathogenen Effektes, der durch große Rundzellen und Retraktionen im Zellrasen gekennzeichnet ist (ROWE et al. 1953).

Alle von Säugetieren isolierten Adenoviren besitzen ein lösliches Antigen, das in Komplementbindung und Präcipitation gruppenspezifisch reagiert (ROWE et al. 1953)

Das Adenovirus-Toxin, ein Faktor, der schon vor Beginn der Virusvermehrung die Zellkultur verändert, wurde im Jahre 1958 von EVERETT und GINSBERG entdeckt. Im gleichen Jahr haben auch ROWE und seine Mitarbeiter das gleiche Toxin als cell-detachment-factor beschrieben.

Die beim Menschen gefundenen 31 Typen wurden aufgrund ihrer serologischen Spezifität im Neutralisationstest, in der Hämagglutinationshemmung (HA-Hemmung) oder in den meisten Fällen in beiden Reaktionen voneinander getrennt. Die Typen 1 bis 18 wurden von(ROWE et al 1956) beschrieben; in den Jahren darauf fand man Typ 19 - 24 (BELL et al. 1960) 25 - 28 (ROSEN et al.), 29 und 30 (ROSEN et al. 1961) und schließlich Typ 31 (PEREIRA et al 1965).

Aufgrund der unterschiedlichen Agglutination mit Blutkörperchen von Ratten und Rhesusaffen kann man die Adenoviren in 4 Untergruppen einteilen (ROSEN 1960)

Untergruppe I:
Die vollständige Agglutination mit Rhesusaffen-, keine

mit Rattenblutkörperchen: Typ 3, 7, 11, 14, 16, und 21.

Untergruppe II:
Vollständige Agglutination mit Rattenblutkörperchen: Typ 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 23, 24, 26, 29 und 30.
Einige dieser Typen reagieren auch mit Rhesusaffenblutkörperchen, aber mit niedrigerem Titer.

Untergruppe III:
Partielle Agglutination mit Rattenblutkörperchen, keine mit Rhesusaffenblutkörperchen: Typ 1, 2, 4, 5 und 6.

Untergruppe IV:
Typ 12, 18 und 31 agglutinieren weder mit Ratten- noch mit Rhesusaffenblutkörperchen: doch ist später auch bei Typ 12 eine Agglutination mit Rattenblutkörperchen beschrieben worden (SCHMIDT et al. 1965).

Eine Gruppenaufteilung gelingt auch mit der Beurteilung des cytopathogenen Effektes (WIGAND und BAUER 1964).
Rundzelltyp: Typen 4, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 2o, 22 - 28.
Retraktionstyp: Typen 1 - 3, 5 - 8, 11, 14, 16 und 21.
Kleine, granulierte Rundzellen, die in Gruppen gelagert sind: Typen 12 und 18.

Diese Gruppeneinteilung stimmt nicht völlig mit der von ROSEN (1960) überein.

Eine HA-Hemmung kann mit den hämagglutinierenden Adenovirustypen durchgeführt werden und sowohl zur Identifikation unbekannter Viren wie auch zum Antikörpernachweis verwendet werden (ROSEN 1960). Alle Arten der Hämagglutinine werden durch homologe Immunseren gehemmt.

Eine partielle Kreuzreaktion zwischen verschiedenen Typen findet man in der Neutralisation bei Tierimmunseren (WIGAND et al. 1965) oder HA-Hemmung (BELL et al. 1960, ROSEN et al. 1961) ganz überwiegend innerhalb der vier Adenovirusgruppen. So reagieren die Typen 7, 11 und 14, 3 und 7, 11 und 21, 4 und 16, 15 und 25; 1, 2, 5 und 6 in der Neutralisation. Die HA-Hemmungsteste zeigen die Typen 7, 11 und 14; 8 und 9, 10 und 19 sowie 15 und 22 Kreuzreaktionen.

Bei Komplementbindung und Präcipitationsreaktion steht das gruppenspezifische Antigen im Vordergrund. Es dient sowohl zur Identifikation eines neuisolierten Virusstammes als Adenovirus, wobei man Menschen-Rekonvaleszentenseren verwendet, als auch zum Nachweis eines Antikörperanstieges bei Menschen.

Ein weiteres gemeinsames Merkmal der Adenoviren ist das Fehlen pathogener Eigenschaften bei den gebräuchlichen Laboratoriumstieren (ROWE et al. 1955). Eine Ausnahme bilden die Typen 12 und 18 (TRENTIN et al. 1962), Typ 7 (GIRARDI et al. 1965) und Typ 31 (PEREIRA et al. 1965). Diese Viren können im Tierversuch Krankheiten hervorrufen, und zwar erzeugen sie, wenn man sie neugeborenen Hamstern inokuliert, maligne Tumoren. Diese sind die ersten bekannten Viren, die für den Menschen pathogen sind und bei Tieren Krebs erzeugen.

Beim Menschen können die Adenoviren verschiedene Krankheitsbilder hervorrufen, insbesondere akute Infektionen der Atemwege mit Entzündungen der verschiedenen Abschnitte des Respirationstraktes (Rhinitis, Tonsillitis, Pharyngitis, Bronchitis, Pneumonie). Infektion

des Magendarmtraktes mit einer Enteritis (Durchfall, oft auch Fieber) einhergehend und gelegentlich Laryngotracheitis und Otitis media. Die epidemische Keratoconjunctivitis geht fast ausschließlich auf eine Infektion mit Adenovirus Typ 8 zurück. Ferner können Adenoviren die Ursache einer Darminvagination bei Kleinkindern sein (RUTTEN und OUDEJANS 1961), und selten eine letale Encephalitis (Van ZAANE et al. 1962) zur Folge haben.

Zum Nachweis von Adenovirusinfektionen werden am besten Virusisolierung und serologische Teste kombiniert. Zur Züchtung benutzt man Rachenabstriche oder Spülflüssigkeit sowie Stuhl. Über Virusisolierung aus Nasenabstrichen, Liquor, Blut und Urin ist berichtet worden (TOTH und OSVATH 1965, ENJALBERT et al. 1960, GUTEKUNST und HEGGIE 1961). Für serologische Diagnostik kommen neben der gruppenspezifischen Komplementbindung Neutralisation und HA-Hemmung in Frage.

2. Adenoviruskomponenten:

Als "Viruskomponenten" werden im folgenden sowohl vom Virus abtrennbare virusspezifische Antigene wie auch die kompletten und inkompletten Viruspartikel selbst bezeichnet. Bei Adenovirus Typ 19, einem Vertreter der Untergruppe II, wurde über die Struktur dieser Komponenten (GELDERBLOM et al. 1967) und ihre serologischen Beziehungen untereinander und zum Virion (GELDERBLOM et al. 1968) berichtet.

Folgende Komponenten wurden untersucht:

a) Das Virion = infektiöses Virus
Das Virion hat ein Ikosaeder-Struktur und

enthält 252 Kapsomere. Seine Größe beträgt 75 mu und die Dichte in CsCl ist 1,35 g/ml. Es ist durch seine Infektiosität und durch Hämagglutination mit Rattenblutkörperchen nachweisbar.

b) Leere Viruskapside
Die leeren Kapsiden (inkomplettes Virus) haben die Größe des Virion (75 mu) und die Dichte in CsCl von 1,31 g/ml. Sie sind durch Hämagglutination mit Rattenblutkörperchen nachweisbar.

c) Hexon = gruppenspezifisches Antigen
Es besteht aus freien Kapsomeren, in denen sich ein Hohlraum befindet. Seine Größe beträgt 8 mu. Die Sedimentationskonstante liegt bei 11,5 S, seine Dichte in CsCl ist 1,31 g/ml, (GELDERBLOM et al. 1967). Es ist mit der (Komplementbindung) KBR gegen antikörperhaltiges Menschenserum nachweisbar.

d) Fiber = typ-spezifisches Antigen
Bei der elektromikroskopischen Untersuchung stellt es sich von unterschiedlicher Länge (10 - 2o mu), als faserformige Struktur dar, deren Ende verdickt ist. Die Sedimentationskonstante liegt bei 6,2 S. Fiberantigen ist durch Komplementbindung gegen ein typ-spezifisches Immunserum oder durch indirekte Hämagglutination nachweisbar, d.h. Blutkörperchen werden nur dann agglutiniert, wenn ein geeignetes heterologes Adenovirus-Immunserum zugesetzt wird.

e) Penton

Das Penton besteht aus dem Fiber-Antigen verbunden mit einer verdickten Basis, die identisch ist mit dem am Virion befindlichen 12 Scheitelkapsomeren (VALENTIN und PEREIRA 1965). Penton läßt sich mit der indirekten HA nachweisen. Außerdem ist seine Basis der Träger der cytotoxischen Aktivität der Adenoviren (VALENTIN und PEREIRA 1965).

f) Dodecon = lösliches Hämagglutinin

Das lösliche Hämagglutinin ist ein sternförmiges Gebilde, das aus 12 Pentons besteht. Die Sedimentationskonstante des löslichen Hämagglutinins beträgt ca. 60 S. Dodecon ist nachweisbar durch Hämagglutination mit Rattenblutkörperchen.

II. Fragestellung

Der toxische Faktor, der in Adenovirus infizierten Zellkulturen den früh auftretenden CPE verursacht (s.o.), hat bisher recht wenig Beachtung gefunden. Wie man weiß (VALENTIN und PEREIRA, 1965), ist er in der Basis des Pentons lokalisiert (s.o.). Die Antigenspezifität dieser Virusteilkomponente scheint komplex zu sein, ist aber noch nicht abschließend geklärt. Ein Weg hierzu ist die Neutralisation der toxischen Aktivität mittels Adenovirus-Immunserum verschiedener Typen.

In der einzigen existierenden gründlichen Untersuchung zu diesem Thema (WADELL und NORRBY, 1969)a wurde die Toxinneutralisation als gruppenspezifisch, das heißt als durch all Adenovirus-Immunseren in gleicher Weise verursacht gefunden. Unsere ersten Befunde mit ungereinigtem Toxin wichen hiervon wesentlich ab. Da WADELL und NORRBY (1969)a mit gereinigtem Penton gearbeitet haben, versuchten auch wir, die toxische Komponente zu reinigen und die mit ungereinigtem Material gewonnenen Ergebnisse mit diesen sowie mit den Daten von WADELL und NORRBY zu vergleichen.

III. MATERIAL und METHODIK:

1. Virus

Wir arbeiten mit Adenoviren der Untergruppe I (Typ 3, 7 a und 11) und Untergruppe III (Typ 2).

a) Konzentrierte und serumfreie Virusvorräte

Viruskonzentrate können mit der " cell-pack" Methode erhalten werden, da die Adenoviren nur in geringer Menge und spät aus den Zellen freigesetzt werden. HeLa-Kulturen (in der Regel drei Tage alt) werden mit einer Virusdosis beimpft, die nach 2 bis 3 Tagen einen maximalen CPE verursacht. Wenn dies erreicht ist, werden die Zellen von der Flasche kräftig abgeschüttelt. Die Zellsuspension wird in ein steriles Standgefäß gegossen und über Nacht in einen kühlen Raum gestellt, damit sie sich absetzen kann. Am nächsten Tag gießt man den größeren Teil des Überstandes in ein Becherglas und wirft es weg. Das Zellsediment wird in geringer Menge in sterilem NaCl aufgenommen, gut verteilt durch vorsichtiges Aufschütteln, zweimal eingefroren und aufgetaut. Hierbei brechen die Zellen auf und das Virus wird frei, ebenfalls die löslichen Antigene. Das Material wird erneut bei ca. 3 000 rpm 10-minutenlang zentrifugiert. Der Überstand ist konzentriertes Rohvirus.

b) Serumfreie Virusvorräte:

Die HeLa-Zellen werden wie üblich beimpft, der Überstand wird nach 24 Stunden bei 37° C abgegossen und die Kultur viermal gründlich mit Hankslösung gewaschen. Dann wird die Kultur mit

serumfreiem Eagle-Medium versehen, die Ernste ist wie oben.

2. Toxinpräparation:
Konzentrierte Virusvorräte wurden in HeLa-Zellkultur hergestellt. Die gepackten Zellen werden wiederholt (2 mal) eingefroren und aufgetaut. Durch niedertourige Zentrifugation werden die Zelltrümmer entfernt. Um das Toxin von dem infektiösen Virus zu trennen, wird das Material in einem Rotor SW 39 bei 22 500 rpm eine Stunde lang auf ein Polster von CsCl (1 ml) mit einer Dichte von 1,4 g/ml zentrifugiert. Der Überstand wird unter denselben Bedingungen erneut zentrifugiert und der zweite Überstand wird bezüglich seiner toxischen Aktivität titriert. Dieser Überstand wird als " lösliches Antigen" bezeichnet. Der verbleibende Infektionstiter liegt weit unter 1 % der Ausgangslösung. Dies schließt das Erscheinen eines CPE innerhalb 2 Tagen nach Inokulation als Folge einer Virusvermehrung aus.

3. Trennungsverfahren - Ionenaustauschchromatographie
a) Geschichtliches:
Ionenaustauschchromatographie wurde schon im Jahre 1850 von THOMPSON und WAY (1850) beschrieben: Gab man auf eine Säule von geschichtetem Ackerboden eine Lösung von Ammoniumsulfat, so erhielt man stattdessen im Durchlauf Calciumsulfat. Die Ammoniumionen werden offensichtlich gebunden, während Calcium frei wurde. Es erwies sich bald, daß es sich um einen reversiblen, stöchiometrischen Vorgang handelte. Diese Beob-

achtung konnte erst in diesem Jahrhundert großtechnisch ausgewertet werden, als man gelernt hatte, synthetische Adsorbentien herzustellen, die seit 1935 durch organische Trägerstoffe (Polykondensations- und Polymerisationsprodukte mit eingeführten austauschaktiven Gruppen) ergänzt werden.

Der Trennungseffekt beruht wieder auf unterschiedlicher Affinität zwischen Adsorbens und den zu trennenden Stoffen, nur daß die Oberflächenbindungen gegenüber polaren elektrochemischen Ionenbindungen weitgehend zurücktreten. Diese kommen durch eine reversible und stöchiometrische Verdrängungsreaktion der an den aktiven Gruppen des Adsorbens befindlichen Ionen durch gleichgeladene aus der Umgebung zustande. Die Zahl der ausgetauschten Ionen wird im Wesentlichen den Zeitpunkt der Lösung der einzelnen Stoffe vom Adsorbens, etwa durch Änderung des pH-Wertes oder Steigerung der Ionenkonzentration, bestimmen; diese beiden Maßnahmen, einzeln oder kombiniert angewendet, machen die Auftrennung naheverwandter Stoffe aufgrund molekularer Unterschiede möglich. Die Fraktionierung menschlichen Serums in 30 Komponenten durch Peterson u.a. (1956) macht die Leistungsfähigkeit der Ionenaustauschchromatographie deutlich.

Wir verwenden zwei Arten von Ionenaustauscher DE 11 WHATMAN (England) und DEAE Sephadex A 25 (Pharmacia Fine Chemical) Uppsala, Schweden).

b) DE 11 WHATMAN Säulenchromatographie: (nach GELDERBLOM u.a. 1968)

Eine Säule von 1,5 cm Durchmesser wurde mit 8 ml bzw. 2o ml gewaschenem DE 11 WHATMAN beschichtet, mit 0,01 M Phosphatpuffer von pH 7,2 äquilibriert und 4 ml bzw. 8 ml löslichem Antigen nach vorheriger Dialyse gegen diesen Puffer eingebracht.

Eluiert wurde mit dem gleichen Puffer in ansteigender NaCl-Konzentration, (0,0; bis 1,0 M NaCl), wobei zwischen 50 und 100 Fraktionen zu 3 ml aufgefangen wurden. Geschwindigkeit 10 bzw. 2o ml/Std. Für die Komplementbindungsreaktion und Hämagglutination wurde ein Teil der Fraktionen gegen 0,9 %-ige NaCl-Lösung dialysiert.

c) DEAE-sephadex A 25 Säulenchromatographie:(nach NORRBY, 1968) a

DEAE-Sephadex A 25 wurde mit reichlichem(ca. 8 l) 0,04 M Tris-HCl Puffer von pH 8,4 bei 20 Grad C gewaschen. Eine Säule von 1,5 bzw. 2,5 cm Durchmesser wurde mit 8 ml bzw. 22 ml DEAE Sephadex A 25 beschichtet und nach vorheriger Dialyse eingebracht.

Eluiert wurde mit dem gleichen Puffer mit ansteigender NaCl-Konzentration (0,04 bis 0,6 M), wobei Fraktionen zu 3 ml bzw. 1o ml aufgefangen wurden. Geschwindigkeit 10 bzw. 2o ml/Std.

4. Test auf Hämagglutination, Komplementbindungsreaktion, Infektiosität und Neutralisation:

a) Toxin-Nachweis:

Die löslichen Antigene bzw. Fraktionen von der

Chromatographie wurden mit 0,2 ml in Verdünnungsstufen mit dem Faktor 2 auf HeLa Zellkultur-Röhrchen verimpft. Der toxische CPE wurde mit 16 - 20 Stunden später abgelesen und in seiner Stärke von 1 + bis 4 + bewertet. Eine Toxin-Einheit ist die Dosis, welche noch einen 1 + CPE hervorruft.

b) Neutralisationstest:
Das Toxin wurde verdünnt, so daß es 2 bis 4 Einheiten Toxin im endgültigen Inokulum enthielt. Es wurde mit einer gleichen Menge Kaninchenimmunserum, welches 1 : 5 verdünnt war, 60 bis 90 Minuten bei 37 Grad C zur Reaktion gebracht und dann in HeLa-Kulturen inokuliert. 24 Stunden später wurde der CPE abgelesen. Eine gleichzeitige Toxintitration wurde jeweils durchgeführt.

c) Komplementbindungsreaktion : (KBR)
Wir benutzten die von Fulton und Dumbell 1949 eingeführte Mikromethode der KBR mit den Änderungen, wie sie WIGAND angibt. Im Prinzip handelt es sich um die von KAUP u.a. 1918 erstmals durchgeführte abgestufte KBR mit variiertem Komplement.

Antigene:
Wir verwendeten Viruseluat und Viruskonzentrat.

Antiseren:
Wir benutzten die im Viruslabor hergestellten Kaninchenseren gegen Prototypen in der Gebrauchsverdünnung von 1:10, außerdem menschliche Rekonvaleszentenseren in Verdünnung von 1:10, was jeweils etwa 4 Antikörpereinheiten entspricht. Zu

den Antigenkontrollen gaben wir bei 62 ° C für 30 Min. inaktiviertes Meerschweinchennormalserum, das in Veronalpuffer 1:50 verdünnt wurde.

Komplement:
Die Seren von 5-10 Meerschweinchen wurden zusammengegeben und in Mengen von 2,5 ml in Schraubflaschen bei 70° C gelagert. Der Komplementtiter war stabil.

Hämolytisches System:
0,5 ml einer 1o%-igen Hammelblutkörperchensuspension, die 3 x in Veronalpuffer gewaschen worden war, wurde mit 0,5 ml 1:100 vorverdünntem Ambozeptor der Behringwerke von Titer 1:4000 und 9 ml Veronalpuffer nach MAYER u.a. versetzt und 10 Minuten bei Zimmertemperatur gehalten.

Durchführung:
Wir benutzten Plexiglastafeln, 18 x 14,3 cm im Ausmaß mit 8 x 10 flach-runden Bohrungen von 1,5 ml Inhalt zur Aufnahme und eine Tropfpipette (Tropfengröße ca. o,o2 ml) zum Eintropfen der Reaktionspartner.

Antigen, Antikörper und Komplement wurden 16 Stunden bei 4 ° C gehalten. Danach ein Tropfen hämolytisches System dazugegeben und durch leichtes Klopfen vermischt. Die Platten wurden zu je 4 im Brutschrank bei 37 ° C für 2 Stunden aufbewahrt.

Vor dem Ablesen verbesserte leichtes Beklopfen

der Platten das Ansammeln der nicht lysierten Blutkörperchen und machte so das Ergebnis eindeutig sichtbar. Die Lage der 50 %-igen Hämolyse schätzten wir auf 0,05 log Komplement ab. Durch Subtraktion der Serum- und Antigenkontrollen vom abgelesenen Wert wurde deren antikomplementäre Wirkung berücksichtigt. Positive KBR nahmen wir oberhalb von einer gebundenen Komplementeinheit (log KE = 0,0) an.

d) Hämagglutinationstest (HA)

Die erhaltenen Fraktionen wurden auf die Fähigkeit zur HA getestet. Wir benutzten die schon bei der Methodik beschriebenen Plexiglasplatten zur Aufnahme und die Tropfpipette zum Eintropfen der Komponenten. Als Verdünnungsmittel diente o,14 m NaCl, das mit 0,004 m Zitronensäure-Phosphatpuffer nach Mc Ilvaine auf pH - 7,2 eingestellt wurde. In jede Vertiefung der Testplatte wurde 0,4 ml der Viruslösung mit 0,2 ml einer 2 %-igen Aufschwemmung von Erythrozyten in NaCl zusammengebracht.

Je nach Vorhaben wurden Affenblutkörperchen (Untergruppe I) oder Rattenblutkörperchen (Untergruppe III) verwendet.

Titrationen des Hämagglutinins erfolgten in Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 in gepufferter physiologischer NaCl. Nach Zusatz der Blutkörperchensuspension wurden die Platten aufgeschüttelt und bei Zimmertemperatur (Untergruppe III) bzw. bei 37 ^{o} C (Untergruppe I) stehengelassen. Das Ablesen erfolgte nach 90 Minuten; als Endpunkt wurde die 50 %-ige Agglutination angegeben.

5. Proteinbestimmung nach Lowry

Methodik:

Reagentien: A= 2o g $Na_2 CO_3$ in 1 l 0,1 n NaOH
lösen b_1 5 g $CuSO_4$ x 5 H_2O in 0,5 l A.dest. lösen
b_2 1o g Na-tartrat x 2 H_2O in 0,5 l A.dest. lösen

B= b_1 + b_2 vor Gebrauch zu gleichen Teilen mischen.

C= 100 ml von Lösung A in 100 ml Meßzylinder abmessen und 2 ml Lösung B zufügen.
(Lösung C ist nur einen Tag haltbar!)

D= verdünntes Folin-Reagenz elektrometisch mit n 1/10 NaOH titrieren (z.B. 10 ml 1:10 verd. Folin-Reagenz vorlegen, bis pH 8 NaOH-Verbrauch 19,55 ml, bis pH 8,5 19,90 ml; da Umschlagpunkt von Phen. zwischen pH 8,3 und 10,0 wurde Verdünnungsfaktor 0,96 aufgenommen = 1 Teil Fol. + 0,96 Teile 1 n NaOH)!

Versuch: 1 ml Proteinlösung (zumeist 0,5 ml + 0,5 ml A.dest.)
+ 5 ml Lösung C zugeben, Röhrchen gut durchschütteln, mindestens 10 Minuten stehenlassen.

+ 0,5 ml Lösung D pro Röhrchen zusetzen und gut schütteln. Reaktionsgemisch minstens 30 Minuten stehenlassen.

Photometrische Mehtoden nach Eppendorf: Filter Hg 546 mm wird benutzt. Kontrolle = Reaktionsgemisch ohne Protein (A.dest!).

IV. ERGEBNISSE

1. Versuche zur Abtrennung und Reinigung der Toxine:

Die durch Chromatographie gewonnenen Fraktionen wurden in den folgenden Tests geprüft:

- Hexon - KBR (gruppenspezifisch)
- Typenspezifische KBR
- Direkte HA
- Indirekte HA
- Toxizität

Die direkte und indirekte HA gaben uns keine wesentliche Information. Das gleiche galt auch für die typenspezifische KBR. Dagegen untersuchten wir im Detail die gruppenspezifische KBR und den Toxingehalt der Fraktionen. Diese beiden Aktivitäten überlagern sich teilweise, obwohl wir die Trennung mit verschiedener Säulengröße und beiden chromatographischen Materialien versucht haben. Ein etwas besseres Ergebnis fand sich bei Typ 2, bei dem die Toxine früher eluiert wurden als das Hexon.

Ein typisches Elution-Diagramm ist in Abbildung 1 dargestellt. Wie man sieht, wird bei Adenoviren Typ 7 die toxische Aktivität in 2 Gipfeln eluiert. Der erste ist stark mit Hexon-Antigen überlagert, während sich der 2. Gipfel mit dem Aktivitätsmaximum der HA deckt. Der Proteinge-

halt der einzelnen Fraktionen ist gleichfalls in Abbildung 1 dargestellt. Der Maximalwert deckt sich mit den Gipfeln von Hexon und Toxin.

2. Abschätzung des Reinigungseffektes:

Als Anhaltspunkte für den erzielten Reinigungseffekt dient uns die Relation von Toxin-Titer zu dem Titer des gruppenspezifischen KB Antigen (Hexon), bestimmt im ungereinigten löslichen Antigen und in den partiell gereinigten Fraktionen mit toxischer Aktivität. In Tabelle 1 sind diese Daten für den einzelnen Versuch dargestellt. Es ist ersichtlich, daß keine kompette Reinigung erzielt wurde, da die Fraktionen ausnahmslos noch gruppenspezifische KBR zeigten. Immerhin ließ sich ein deutlicher Reinigungseffekt bei den Typen 2 und 3 erzielen, während dieser bei den Typen 7 und 11 nicht eintrat. Offenbar geht in diesen Viren zu viel Toxin bei der Chromatographie verloren.

Immerhin ist bemerkenswert, daß sich im gereinigten Material kein Zell-Eiweiß durch KBR gegen HeLa-Antiserum mehr nachweisen ließ. Die Säulen-Chromatographie hat also wenigstens einen großen Teil des Wirtzellproteins eliminiert.

3. Homologe Toxinneutralisation:
Es fand sich, daß die Neutralisation von Toxin durch homologe Antisera schwach war. Die Serumtiter waren niedrig und hingen stark von der benutzten Toxindosis ab. Die Neutralisationstiter waren in allen Fällen gleich hoch, unabhängig davon, ob Roh-Toxin oder fraktioniertes Toxin verwendet wurde. (siehe Tabelle 2)

Im allgemeinen wurden homologe Neutralisationstiter, die über 1:20 hinausgingen, nur mit außergewöhnlich niedriger Toxindosis erhalten. Folglich ist es ausreichend, die Kreuzneutralisationen mit Serumverdünnung von 1:5 durchzuführen; noch höhere Serumkonzentration könnte für die Zellen toxisch sein.

4. Heterologe Toxinneutralisation mit partiell gereinigtem Toxin:

Die Toxine der Untergruppe I reagierten, wie in Tabelle 3 gezeigt. Während das Toxin vom Typ 7 nur mit seinem homologen Serum und einem Typ 5-Antiserum reagierte, wurde Typ 3 -Toxin durch Typ 7 und Typ 5 -Antikörper, in einem Teil der Versuche auch durch Typ 16 -Antikörper neutralisiert. Das Toxin von Typ 11 reagierte mit Antiseren der Typen 3, 7 und 14, aber nicht mit Typ 16 und Typ 21 -Antiseren.

Die Reaktion von Typ 3- und Typ 7 -Toxin mit Antiserum der Typen 5 und 1 ist unerwartet, insofern als diese Viren zu anderen Untergruppen gehören. Die Spezifität der Reaktion wurde dadurch geprüft,

daß von dem gleichen Kaninchenserum vor Beginn des Immunserum getestet wurde. Dieses zeigte keine Toxinneutralisation, wodurch die Spezifität der Kreuzreaktion bestätigt wurde.

Die Neutralisation mit ungereinigtem löslichen Antigen verhielt sich in allen Fällen gleich wie diejenige mit gereinigtem Toxin.

Typ 2 der Untergruppe III reagierte mit allen Antiseren der Typen 1, 2, 5 und 6 -Antiseren und nicht mit anderen Antiseren, gleichgültig ob gereinigtes oder ungereinigtes Virusmaterial benutzt wurde.

V. DISKUSSION:

Die Spezifität der Neutralisation von Adeno-Virus-Toxinen durch Immunseren verschiedener Typen ergibt aus den oben geschilderten Befunden und einer Reihe weiterer, die gesondert publiziert werden (DÖRING et al., 1972), das folgende Bild:

Die Toxine der Untergruppe III (Typ 1,2,5 und 6) reagierten untergruppenspezifisch, d.h. die Toxine der vier Typen zeigten eine komplette Kreuzneutralisation mit ihren Immunseren und keine Reaktion mit Immunseren anderer Typen. Als Vertreter wurde in der vorliegenden Studie der Typ 2 untersucht; die untergruppenspezifische Reaktion wurde mit löslichem Antigen sowie mit gereinigtem Toxin in gleicher Weise gefunden.

Die in der vorgelegten Studie nicht untersuchten Viren der Untergruppe IV (Typ 12, 18 und 31) scheinen ebenfalls untergruppenspezifisch zu reagieren (DÖRING et al., 1972). Allerdings sind weitere Versuche zu dieser Frage erforderlich, die dadurch erschwert werden, daß diese Typen nur sehr wenig Toxin bilden.

Bei den Untergruppen I und II fand sich dagegen keine untergruppenspezifische Reaktion. Selbst das am weitesten kreuzende Toxin vom Typ 11 reagierte nicht mit den Immunseren der Typen 16 und 21, also nicht mit allen Immunseren dieser Untergruppe. Die Reaktionen verliefen bei den Viren der Untergruppe I (siehe Tabelle III und DÖRING et al., 1972) und Untergruppe II (DÖRING et al.) weitgehend typenspezifisch, allerdings mit einigen Ausnahmen. So wurde das Toxin vom Typ 3 auch durch Typ 7 -Immunserum, das Typ 11 - Toxin durch Immunseren der

Typen 3, 7 und 14 regelmäßig und eindeutig neutralisiert. Der zuletzt genannte Befund stand in Parallele zu den Kreuzreaktionen der Typen 7, 11 und 14 in Neutralisation und HA-Hemmung (STEVENS et al., 1967, SOERGWIDJOJO und Wigand 1972), wobei allerdings das Toxin vom Typ 7 (Tabelle 3) und 14 (DÖRING et al.) nicht kreuzte, sondern typenspezifisch reagierte. Die Neutralisation vom Typ 3- und 7 -Toxin durch ein Immunserum vom Typ 5 (Tabelle 3) war unerwartet. Wenngleich es sich dabei um eine echte Antikörperbildung handelte, da das vor der Immunisierung entnommene Serum des Tieres keine Neutralisation zeigte, können wir diesen Befund nicht mit der Komponentenstruktur der Adenoviren in Einklang bringen. Keinesfalls darf daraus eine gruppenspezifische Reaktion gefolgert werden, da nicht nur die in Tabelle 3 dargestellten, sondern zahlreiche weitere Seren außerhalb der Untergruppe I keine Reaktion mit diesen Toxinen erkennen ließen.

Über die Toxinneutralisation wurde außer einigen vorläufigen Resultaten (EVERETT und GINSBERG, 1958, ROWE et al. 1958)anur eine ausführliche Mitteilung publiziert (WADELL und NORRBY 1969)a Diese Autoren neutralisierten gereinigte Pentons der Typen 2 und 3 mit Antiseren, die gegen Viruskomponente verschiedener Serotypen hergestellt worden waren. Sie fanden dabei eine gruppenspezifische Neutralisation mit allen Antiseren, die gegen Pentons oder Polymere von Pentons von Adenoviren dreier Untergruppen hergestellt worden waren. Dies steht im Widerspruch zu unseren Befunden. Da jedoch die Pentonantiseren, die WADELL und NORRBY benutzten, höhere homologe Titer zeigten als die unseren, während die heterologen

Titer mit Viren außerhalb der Untergruppe allgemein niedrig lagen, ist anzunehmen, daß eine schwache gruppenspezifische Reaktion neben einer stärkeren Typen- oder Untergruppen-Spezifität vorlag. Die gruppenspezifische Reaktion dürften wir wegen der geringeren Wirksamkeit unserer Antiseren nicht nachgewiesen haben.

Es wäre möglich gewesen, daß man bei Gebrauch von ungereinigtem Material eine schwächere Neutralisation erhält, dadurch daß sich andere im Überschuß vorhandene Virusantigene und Zellproteine kompetitiv mit den im Immunserum vorhandenen Antikörpern verbinden. Diese Überlegung gab den Anlaß, die Adenovirus-Toxine zu reinigen. Die chromatographische Reinigung führte nicht in allen Fällen zu befriedigenden Ergebnissen. Immerhin war durch Entfernung des HeLa-Zellproteins und eines großen Teils anderer Virusantigene eine weitgehende Reinigung erfolgt. Da die homologen Neutralisationstiter und heterologen Kreuzreaktionen mit ungereinigtem Material ausnahmslos gleich ausfielen wie mit ungereinigtem löslichen Antigen, ist die Diskrepanz zu den Befunden von WADELL und NORRBY (1969)$_a$ nicht durch den Gebrauch ungereinigter Toxine zu erklären. Vielmehr dürfte die oben angeführte Deutung zutreffen.

Bei allen Seren fanden sich in dieser Studie und auch bei DÖRING et al. nur niedrige homologe Neutralisationstiter gegen das Toxin, während die Neutralisationstiter dieser Seren gegen infektiöses Virus und HA-Hemmungstiter weit höher liegen. WADELL und NORRBY erhielten durch Immunisierung mit gereinigtem Penton wesent-

lich höhere Toxin -Neutralisationstiter. Dies erklärt sich möglicherweise durch die "Konkurrenz der Antigene" bei der Immunisierung mit einem Gemisch verschiedener Viren - und Zellantigene, wie dies bei Immunisierung mit Vollvirus zur Wirkung kommt.

Das in Abbildung 1 dargestellte Elutions-Diagramm zeigt neben der partiellen Überlagerung von Toxin und gruppenspezifischem Antigen (Hexon) einen zweiten Gipfel der toxischen Aktivität, der sich mit dem Hämagglutinin deckt. Dies entspricht den Erwartungen, da das Hämagglutinin bei Typ 7 ein Dodecon ist, also ein Penton-Polymer, das die toxisch wirkende Pentonbasis enthält.

ZUSAMMENFASSUNG

Adenoviren der Untergruppe I (Typ 3, 7a und 11) und II (Typ 2) wurden als serumfreie konzentrierte Vorräte in HeLa-Zellkulturen hergestellt. Durch zweimaliges Zentrifugieren auf ein Polster von Cäsiumchlorid wurden die löslichen Antigene von infektiösem Virus befreit. Die Auftrennung der löslichen Antigene erfolgte durch Säulenchromatographie an DEAE-Zellulose bzw. DEAE-Sephadex A 25. Es zeigte sich, daß das untersuchte Toxin der Untergruppe III (Typ 2) untergruppenspezifisch reagiert. Bei der Untergruppe I fanden sich dagegen keine untergruppenspezifischen, sondern weitgehend typenspezifische Reaktionen.

Die chromatographische Auftrennung führte nicht in allen Fällen zu einer befriedigenden Reindarstellung der Toxine. Immerhin wurde das HeLa-Zellprotein und ein großer Teil anderer Virusantigene eliminiert. Derart partiell gereinigte Toxine reagierten in allen durchgeführten Untersuchungen identisch mit ungereinigtem löslichen Antigen.

AUFARBEITUNGSGÄNGE UND REINIGUNGSEFFEKT

TABELLE 1:

Typ	Säule	Toxinausgangstiter	Hexonausgangstiter	Toxin-Titer in gereinig.Frakt.	Hexon-Titer in gereinig.Frakt.	Reinigungseffekt (-fach)
A_2	DE 11 Whatman (8 x 1,5 cm)	64	5.12o	8	8o	8
A_2	DE 11 Whatman (2o x 1,5 cm)	16	5.12o	2	2o	32
A_2	DEAE Sephadex A 25 (2o x 1,5 cm)	8	5.12o	4	32o	8
A_2	DEAE Sephadex A 25 (22 x 2,5 cm)	16	5.12o	1	64	5
A_3	DE 11 Whatman (8 x 1,5 cm)	32	5.12o	16	2o	13o
"	DE 11 Whatman (2o x 1,5 cm)	32	5.12o	16	8o	32
"	DEAE Sephadex A 25 (2o x 1,5 cm)	64	5.12o	16	32o	4
"	DEAE Sephadex A 25 (22 x 2,5 cm)	16o	5.12o	2	8o	keine
A_{7a}	DEAE Sephadex A 25 (2o x 1,5 cm)	8	5.12o	1	32o	2,o
"	DEAE Sephadex A 25 (22 x 2,5 cm)	16o	5.12o	2	8o	keine
"	DEAE Sephadex A 25 (25 x 2,5 cm)	16o	5.12o	8	8o	2,o

TABELLE 1 FORTSETZUNG:

Typ	Säule	Toxinausgangstiter	Hexonausgangstiter	Toxin-Titer in gereinigt.Frakt.	Hexon-Titer in gereinigt.Frakt.	Reinigungseffekt
A 11	DE 11 Whatman (2o x 1,5 cm)	16o	1.28o	4	32o	keine
"	DEAE Sephadex A 25 (2o x 1,5 cm)	64	1.28o	1	32o	keine
"	DEAE Sephadex A 25 (22 x 2,5 cm)	32	1.28o	1	8o	keine

TABELLE 2:

Homologe Toxinneutralisationen

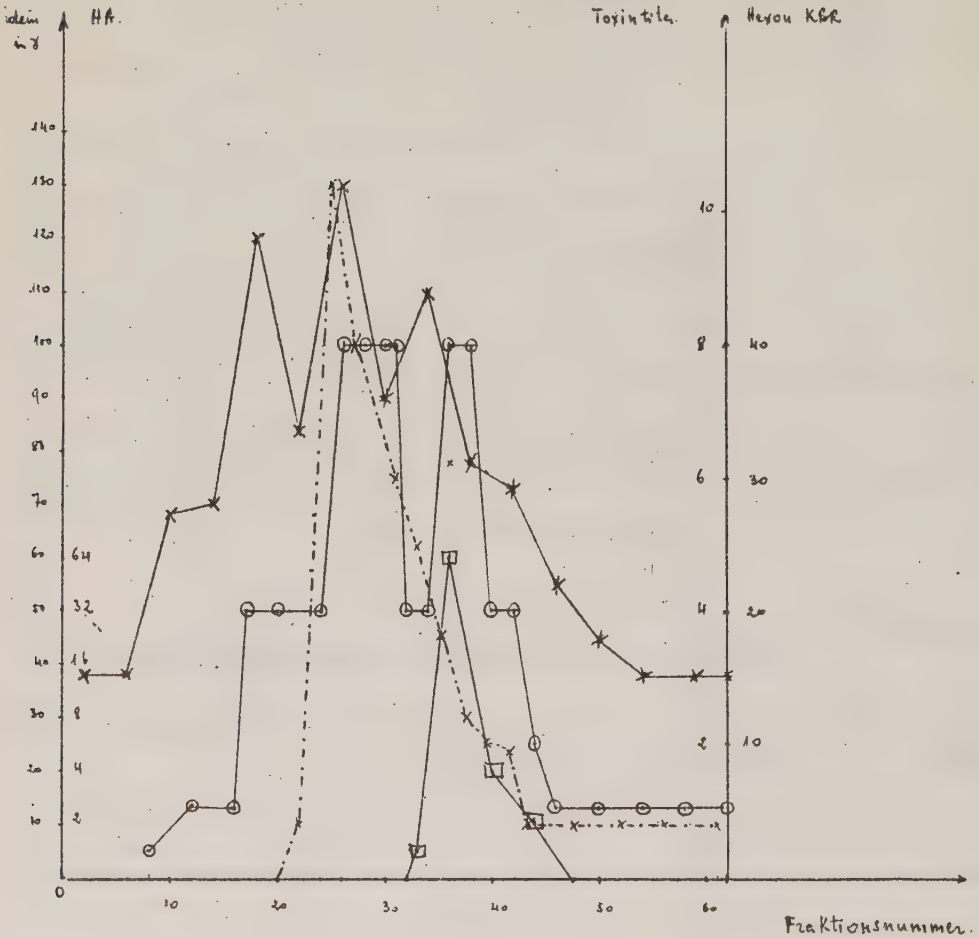
Virustyp	Antigen	Serenverdünnung 1 :					
		5	10	20	40	80	ø
2	roh	0	1	1	1-2	2	2
	gereinigt	0	0-1	0-1	1-2	2	2
7	roh	0	0	±	±	0-1	1
	gereinigt	0	0	0	±	0-1	1
11	roh	0	1-2	3-4	4	4	4
	gereinigt	0	1	1	3	3-4	4

Ausmaß des toxischen CPE

Tabelle 3: Kreuzneutralisation der Toxine der Untergruppe I

Virustyp	Immunserum - Typ							
	3	7a	11	14	16	21	1	5
3	+	+	-	-	+	-	+	+
7a	-	+	-	-	-	-	-	+
11	+	+.	+	+	-	-	-	-

DIAGRAM 1 Chromatographie von Adeno-Virus Typ 7a mit DEAE-Sephadex



Protein (n. Lowry) Extinktion bei 1:10 verdünnt Material

Toxintiter.

Heron KBR.

HA.

LITERATURVERZEICHNIS:

BARSKI, G.: Caractère spécifique de la lésion cellulaire causée in vitro par les virus du groupe APC et sa valeur diagnostique. Annal Inst.Past.,91,614(1956)

BAUER, H. und WIGAND,R.: Eigenschaften der Adenovirus-Hämagglutinine. Z.Hyg.Infektionskrankh.,149,96-113 (1963)

BELL, S.D.jr.,ROTA,T.R. and McComb, D.E.: Adenovirus isolated from Saudi Arabia III. Six new serotypes. Amer.J.Med.a.Hyg.,9, 523, (196o)

BOYER, G.S.,LEUCHTENBERGER, C. und GINSBERG,H.S.: -Cytological and cytochemical studies of HeLa cells infected with adenoviruses. J.exp.Med.,1o5,195-216 (1957)

BREUG,R. und WIGAND,R.: Die Hämagglutinine der Adenoviren Typ 26, 9 und 9 - 15. Zbl.Bakt.I.Abt.Orig.,214,1-8, (197o)

DÖRING,N.,NGUYEN,C.X. und WIGAND, R.: Neutralization of adenovirus toxins: specificity and antigenic relationships. Med.Microbiol.Immunology,157,325-334, (1972)

DORFNER, K.: "Ionenaustauscher, Eigenschaften und Anwendungen" - Walter de Gruyter & Co.,Berlin, (1963)

ENDERS, J.F., BELL, J.A., DINGLE, J.H., FRANCIS, T. Jr., HILLEMANN, M.R., HUEBNER, R.J. und PAYNE, A.M. - M.
"Adenoviruses": Group name proposed for new respiratory tract viruses.
Science, 124, 119-12o, (1956)

ENJALBERT, L., DIDIER, J., LARENG, M., B. & LAPCHINE, L.:
Les adénovirus. Etude de 17 souches isolées à Toulouse.
Ann. Inst. Past., 99, 6o8, (196o)

EVERETT, S.F. und GINSBERG, H.S.:
A toxin like material separable from typ 5 adenovirus particles.
Virology, 6, 77o, (1958)

FULTON, F. und DUMBELL, K.R.:
The serological comparison of strains of influenza virus - Zit. nach WIGAND, 1956.
J.gen.Microbiol., 3, 97, (1949)

GELDERBLOM, H., BAUER, H., FRANK, H. und WIGAND, R.:
The structure of group II adenoviruses.
J.gen.Virol., 1, 553-560, (1967)

GELDERBLOM, H., MEISER, W., LENGYEL, A. und WIGAND, R.:
The serological relationship of the soluble antigens of adenovirus type 19.
J.gen.Virol., 2, 331-340, (1968)

GIRARDI, A.J., LARSSON, V.M., and HILLEMAN, M.R.:
Further tests in hamsters for oncogenie quality of ordinary viruses and mycoplasma with correlative review.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 118, 173, (1965)

GRUMBACH, A. und BONIN, O.: Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger. Stuttgart, 1969.

GITEKUNST, R.R. and HEGGIE, A.D.: Viremia and viruria in adenovirus infections. Detection in patients with rubella or rubelliform illness. New Engl.J.Med., 264, 374,(1961)

HILLEMAN, M.R.,TOUSIMIS, A.J. und WERNER, J.H.: Biophysical characterization of the RI (RI-67) viruses. Proc.Soc.exp.Biol.,89,587-593, (1955)

HILLEMAN, M.R. and WERNER, J.H. : Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness. Proc.Soc.exp.Biol.a.Med.,85,183, (1954)

HUEBNER, R.J.,ROWE,W.P., WARD, T.G.,PARROT, R.H. und BELL, J.A.: Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents. A newly recognized group of common viruses of the respiratory system. New Engl.J.Med., 251,1077-1086, (1954)

KAUP, J.,BALSER, I.,HATZIWASSILIU und KRETSCHMER,J. Kritik der Methode der WaR und neue Vorschläge für die quantitative Messung der Komplementbindung. Arch.Hyg.,87, (1918) - Zit.nach WIGAND (1956)

LIEM,I.T.F.,KRON,I. und WIGAND, R.: Dodecon, das lösliche Hämagglutinin bei allen Adenoviren der Untergruppe II. Arch.f.d.ges.Virusforsch.,33, 177-181, (1971)

LOWRY, O.H.,ROSEBROUGH, N.J.,FARR, A.L. und RANDALL, R.J.: Protein messurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem.,193, 265, (1951)

MAYER,M.M.,OSLER,A.G., BIER,O.G. und HEIDELBERGER, M.: The activating effect of magnesium and other cations on the hemolytic function of complement. J.exp.Med., 84, 535, (1946) - Zit. nach WIGAND (1956)

MEISER, W., LANGE, J., LOYTVED, D. und WIGAND,R.: Typenspezifischer adenovirusantigene. Arch.f.d.ges.Virusforsch.,26, 355-365, (1969)

NORRBY, E.: The relationship between the soluble antigens and the Virion of adenovirus type 3. I. Morphological characteristics Virology, 28 , 236-248,(1966)a

NORRBY, E.: II. Identification and characterization of an incomplete hemagglutinin. Virology, 30, 608-617,(1966) b

NORRBY, E.: Identification of soluble components of adenovirus Type 11
J. gen. Virol., 2, 123-133,(1968) a

NORRBY, E.: Comparison of soluble components of adenovirus types 3 und 11
J. gen.Virol.,2,135-142,(1968) b

NORRBY, E.: IV. Immunological complexity of soluble components.
Virology, 37, 565-576,(1969)

NORRBY, E. and SKAARET, P.: III. Immunological identification of fiber antigen and isolated vertex capsomer antigen.
Virology, 32, 489-5o2, (1967)

PEREIRA,M.S.,PEREIRA, H.G. and CLARKE, S.K.R.: Human adenovirus type 31 - a new serotype with oncogenic properties.
Lancet, 15, (1965) I

PETERSON, E.A. and SOBER, H.A.: Chromatography of proteins I
J.Am.Chem.Soc.,78,751-755,(1956)

ROSEN, L.: A hemagglutination-inhibition technique for typing of adenoviruses.
Amer.J.Hyg.,71,12o-128,(1960)

ROSEN, L., BARON, S. and BELL, J.A.: Four newly recognized adenoviruses.
Proc.Soc.exp.Biol., 1o7,434-437, (1961)

ROWE, W.P.,HARTLEY,J.W., and HUEBNER, R.J.: Serotype composition of the adenovirus group. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,97,26o, (1958) a

ROWE, W.P.,HARTLEY, J. W., ROIZMAN, B. and LEVY, H.B.: Characterization of a factor formed in the course of adenovirus infection of tissue cultures causing detachment of cells from glass. J.exp.Med., 1o8, 713, (1958) b

ROWE, W.P.,HUEBNER,R. J.,GILMORE, L.K.,PARROT, R.H. and WARD, T. G.: Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc.Soc.exp.Biol.,84,57o-573, (1953)

ROWE, W.P.,HUEBNER,R.J., HARTLEY, J.W., WARD,T. G., and PARROT, R.H.: Study of the adenoidal-pharyngeal conjunctival (APC) group of viruses. Am.J.Hyg.,61,197,(1955)

RUTTEN, A. and CUDEJANS, E.: Abdominal manifestations of adenovirus infections in infants. Lancet, 597, (1961) II

SCHMIDT,N.J.,KING,C.J. and LENNETTE, E.H.: Hemagglutination and hemagglutination - inhibition with adenovirus type 12. Proc.Soc.exp.Biol.,118,2o8-211, (1965)

SOEROWIDJOJO, M. und WIGAND, R.: Doppelimmunisierung von Kaninchen mit Adenoviren der Untergruppen I und III. Med.MicrobiolImmunol.,157, 132-141, (1972)

SOBER,H.A.,GUTTER,F.J., WYCKHOFF, M.M. and PETERSON,E.A.: Chromatography of proteins II. J.Am.Chem.Soc.,78,756-763, (1956)

STEVENS, D.A.,SCHAEFFER, M.,FOX,J.P.,BRANDT,C.D., ROMANO, M.: Standardization and certification of reference antigens and antisera for 3o human adenovirus serotypes. Am.J.Epidemiol.,86,617,(1967)

TOTH, M. and OSVATH,P.: Adenovirus type 7 outbreak in a kindergarten. Acta microb.Acad.Sci.hung.,12, 39, (1965)

VALENTIN,R.C. and PEREIRA, H.G.: Antigens and structure of the adenovirus. J.Mol.Biol., 13, 13-2o, (1965)

TRENTIN, J.J.,YABE,Y. and TAYLOR, G.: The quest of human cancer viruses. A new approach to an old problem reveals cancer induction in hamsters by human adenovirus. Science, 137, 835, (1962)

WADELL, G.: Hemagglutination with adenovirus serotypes belonging to Rosen's subgroups II and III. Proc.Soc.exp.Biol.and Med.,132, 413-421, (1969)

WADELL, G. and NORRBY,E.: Immunological and other biological characteristics of pentons of human adenoviruses. J.of Virology, 4, 671-680, (1969) a

WADELL, G. and NORRBY,E.: The soluble hemagglutinins of adenoviruses belonging to Rosen's subgroup III. II. The slowly sedimenting hemagglutinin. Arch.f.d.ges.Virusforsch.,26, 53-62, (1969) b

WADELL, G., NORRBY,E. and SKAARET, P. : The soluble hemagglutinins of adenoviruses belonging to Rosens's subgroup III. I. The rapidly sedimenting hemagglutinin. Arch.f.d.ges.Virusforsch.,26, 33-52, (1969)

WIGAND, R., HAAS, R. und VIVELL, O.: Serologische Reaktionen bei Virus- und Rickettsieninfektionen. Virus- und Rickettsieninfektionen des Menschen. J.F.Lehmann Verlag München (1965)

WIGAND, R.: Serologische Beziehungen der Adenoviren der Gruppe II. Arch.f.d.ges.Virusforsch.,23, 4o-47, (1968)

WIGAND, R. und BAUER,H.: Über den cytopathogenen Effekt der Adenoviren des Menschen. Arch.ges.Virusforsch.,14,674-682, (1964)

WIGAND, R.,BAUER,H.,LANG, F. and ADAM, W.: Neutralization of adenoviruses 1 to 28: Specifity and antigenic relationship. Arch.ges.Virusforsch.,15,188, (1965)

WIGAND, R. and FLIEDNER, D.: Serologically intermediate adenovirus strains: a regular feature of group II adenoviruses. Arch.f.d.ges.Virusforsch.,24, 245-256 (1968)

WIGAND, R. and MEISER,W.: Neutralization of adenoviruses by component antisera. Arch.f.d.ges.Virusforsch.,27, 112-114, (1969)

WIGAND, R.,WUNN, W.: Die Vermehrung von Adenoviren der Gruppe II in HeLa-Zellen. Arch.f.d.ges.Virusforsch.,21, 1-1o, (1967)

WIGAND, R., WUNN, E., SCHMIDT,W.A.K. and GELDERBLOM, H.: Verfahren zur Trennung von Adenovirus-Antigenen. Arch.f.d.ges.Virusforsch.,19, 319-333, (1966)

VAN DER ZAANE, D.J., SPRANGERS, M. and VAN DER VEEN, J.: Ganreen, hersenafwijkingen en myocardbeschadiging bij adenoviruspneumonieen. Nederl.Tijdschr.v.Geneesk,105, 1281, (1961) - Zit. nach Bull. Hyg.,37, 185, (1962)

WIGAND, R.: Erfahrungen mit der Mikromethode der Komplementbindungsreaktion. Z.f.Hyg.u.Infektionskrankh.,143, 188 - 956, (1956),

Herrn Professor Dr. med. R. Wigand danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die Anregungen, Unterstützungen und kritische Beratung bei der Durchführung.

Frau Ingrid Maurer danke ich für die Herstellung der Gewebekulturen.

L e b e n s l a u f

Am 1o. April 1932 wurde ich als Sohn des Lehrers Nguyen-Van-Hue und seiner Ehefrau, der Lehrerin Nguyen-Thi-Hon, in Cocong (Südvietnam) geboren. Nach Grundschulausbildung und Mittelschulausbildung in Vietnam und in Frankreich habe ich im Jahre 1952 mein Abitur in Paris abgelegt. Anschließend habe ich mein Medizinstudium an der Universität Louvain (Belgien) angefangen. Im Jahre 1957 habe ich mein Physikum an der Universität Saarbrücken (Homburg/Saar) abgelegt. Meine klinischen Semester habe ich an der Universität Wien (Österreich) und Saarbrücken (Homburg/Saar) fortgesetzt. Im Jahre 197o legte ich hier mein Staatsexamen ab und erhielt 1971 die ärztliche Approbation.